

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 14 MAY 2004

WIPO PCT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

103 12 846.8

**Anmeldetag:**

21. März 2003

**Anmelder/Inhaber:**

Medinnova Gesellschaft für medizinische Inno-  
vationen aus akademischer Forschung mbH,  
35037 Marburg/DE

**Bezeichnung:**

Testsystem zur Auffindung von Substanzen zur För-  
derung des Neuritenwachstums

**IPC:**

C 12 Q 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. April 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Faust



## Testsystem zur Auffindung von Substanzen zur Förderung des Neuritenwachstums.

### 5 Gebiet der Erfindung.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren sowie ein Testsystem zur Suche oder Prüfung von Wirksubstanzen, welche das Wachstum und/oder das Überleben von Nervenzellen beeinflussen, insbesondere fördern, damit erhältliche  
10 Wirkstoffe, Verwendungen des Testsystems sowie Verwendungen der Wirkstoffe.

### 15 Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

Die Funktion von Nervenzellen ist abhängig von der Ausbildung und dem Erhalt funktionsfähiger Neuriten. Da eine beträchtliche Anzahl neurodegenerativer Erkrankungen,  
20 (beispielsweise Alzheimer Erkrankung, diabetische Neuropathie, multiple Sklerose und die Schädigungen nach cerebraler Ischämie) einhergehen mit Degenerationen von Neuriten, besteht ein erheblicher Bedarf an Substanzen, welche das Neuritenwachstum fördern und die Degeneration  
25 von Neuriten hemmen.

Ribonukleoproteine (RNP) sind RNA bindende Proteine, beteiligt an der Biogenese, dem Transport und der Funktion von mRNA und rRNA. Zu den RNP gehören die "small nuclear"  
30 Ribonukleoproteine (snRNP) und die "heterogeneous nuclear" Ribonukleoproteine (hnRNP). hnRNPs spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Aspekten des RNA-Stoffwechsels wie z.B. Splicing, Transport, Poly-Adenylierung,

Stabilisierung und Translation (Review: Krecic and Swanson, 1999; Literaturliste mit vollständiger Bibliographie siehe Ende der Beschreibung).

- 5 Von einigen snRNP ist bekannt, dass sie Bindungspartner darstellen für das "Survival motor neuron" (SMN) Protein (Liu und Dreyfuss, 1996; Meister et al 2000). SMN ist im Komplex mit einigen anderen Proteinen wie Gemin 2, Gemin 3, und Gemin 4 anzutreffen, bindet an U snRNAs (Fischer et al 1997, Bühler et al 1999; Selenko et al 2001) und ist an der Biogenese und Funktion von snRNPs, dem "splicing" Prozess der pre-mRNA und der Prozessierung und Modifikation von rRNA beteiligt (Pellizzoni et al Curr Biol 11: 1074-1088, 2001; Friesen et al Mol Cell 7:1111-1117, 2001).
- 15 Neuere Befunde zeigen, dass auch spezielle hnRNPs (hnRNP-R und hnRNPQs) mit normalem SMN Proteinen interagieren, während mutiertes SMN von Patienten mit spinaler muskulärer Atrophie (SMA) nicht an hnRNPs bindet (Mourelatos et al. EMBO J 20:5443-5452, 2001). Für diese speziellen hnRNPs wurde wiederum ihre Beteiligung an dem Splicing-Prozess der m-RNA belegt (Mourelatos et al EMBO J 20:5443-5452, 2001).
- 25 Mutationen oder Deletionen des Genes für SMN führen zur Reduktion von funktionellem SMN-Protein und somit zum Auftreten der spinalen muskulären Atrophie (SMA), einer autosomalen rezessiven Muskelerkrankung, bei welcher durch eine progressive Degeneration der Motorneuronen eine fortschreitende Muskelschwäche und Muskelatrophie entsteht. (Korinthenberg et al 1997 ; Melki, 1997).
- 30

Die Kausalität ist in soweit belegt, als eine verminderte Expression von SMN zur Apoptose von Motoneuronen des Vorderhorns des Rückenmarkes und zur SMA (Crawford und Pardo 1996) führt, und bei Mäusen zur Degeneration von Motoneuronen führt (Jablonka et al., 2000).

Jedoch scheint trotz dieser Kausalität das SMN Protein kein Überlebensfaktor für Motoneurone zu sein, da eine Überexpression des normalen SMN Proteins Motoneuronen nicht vor Zelltod, beispielsweise verursacht durch Entzug von trophischen Faktoren, schützt (Cisterni et al. Neurobiol Dis 8:240-251, 2001). Desweiteren ist es fraglich, ob bei der SMA der Splicing Prozess der mRNA in Motoneuronen beeinträchtigt ist (Jablonka et al 2000; Tucker et al 2001).

Trotz des Fortschritts im Verständnis der Funktion von SMN beim pre-mRNA-Splicing ist nur wenig über den Pathomechanismus in der SMA bekannt. Es bleibt eine offene Frage, warum verringerte Mengen an funktionellem SMN-Protein in allen Geweben zu einem spezifischen Absterben von Motoneuronen führen kann. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass SMN zusätzliche Motoneuronenspezifische Aufgaben erfüllt. Diese Funktion könnte auf der Interaktion mit Motoneuronen-spezifischen Proteinen basieren. SMN ist außer in nukleären Strukturen auch im Zytoplasma von Motoneuronen, einschließlich der Dendriten und Axonen lokalisiert (Pagliardini et al., 2000).

Die SMA gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen, die sich durch Degeneration von Nervenzellen auszeichnen. Hierzu zählen Alzheimer, diabetische Neuropathie, Multiple Sklerose und die Folgeerkrankungen der cerebralen

Ischämie. Eine Prophylaxe oder Therapie dieser Erkrankungen ist derzeit, wenn überhaupt, nur eingeschränkt möglich. Neue Verfahren zur Suche nach Wirksubstanzen wie auch Wirksubstanzen zur Prophylaxe oder Therapie dieser 5 Erkrankungen werden somit dringend benötigt.

Neuere Befunde zeigen (Rossoll et al., 2002), dass i) spezielle hnRNPs, genannt hnRNP-R und hnRNP-Q, obwohl sie im Organismus ubiquitär in Zellen anzutreffen sind, 10 während der Embryogenese im Rückenmark am stärksten exprimiert werden, ii) dass hnRNP-R im wesentlichen im Zytoplasma von Motoneuronen exprimiert wird, und zwar besonders in deren Axonen, geringer in Axonen von sensorischen Neuronen und iii) dass die Überexpression von hnRNP- 15 R oder von hnRNP-Q in Nervenzellen zu einem erheblich verstärktem Wachstum von Neuriten führt.

A Technisches Problem.

20

Der Erfindung liegt daher das technische Problem zu Grunde, ein Testsystem, mit welchem sich Wirkstoffe identifizieren lassen, die sich zur Prophylaxe und/oder Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen und/oder 25 Nervenschäden durch Verletzungen eignen, sowie solche Wirkstoffe anzugeben.

Der Erfindung zu Grunde liegende Erkenntnisse.

30

Grundlage der Erfindung ist der überraschende Befund, dass die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine R und Q (hnRNP-R und hnRNP-Q), von denen bekannt ist, dass sie das

Wachstum von Neuriten erheblich fördern, gemeinsam mit dem Produkt des Smn-Genes an die mRNA von  $\beta$ -Aktin spezifisch binden und dass dieser Komplex in die Axone und Wachstumszonen von Motoneuronen transloziert.

5

Grundzüge der Erfindung und bevorzugte Ausführungsbeispiele.

- 10 Gegenstand der Erfindung sind somit Substanzen, welche zur Steigerung der Bildung von Komplexen aus folgenden Komponenten in Nervenzellen führen (1) hnRNP, in besonderem von hnRNP-R und hnRNP-Q, sowie aller ihrer Splicing-Isoformen, (2) SMN-Protein und (3)  $\beta$ -Aktin mRNA, Testsysteme zur Auf-  
 15 findung von solchen Substanzen wie auch zur Ermittlung des Funktionszustandes von Nervenzellen, wobei  $\beta$ -Aktin allein (mRNA oder Protein) oder in Kombination mit mindestens einer weiteren Komponente dieses Komplexes nachgewiesen wird und die Verwendung dieser Substanzen für die Prophylaxe und/oder Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen  
 20 oder Nervenschäden durch Verletzungen.

In einer besonderen Ausführungsform dieser Erfindung fördern diese Substanzen die Komplexbildung von hnRNP-R und/oder von hnRNP-Q inklusive aller Splicing-Isoformen (in weiterer Folge nur noch hnRNP-R und -Q genannt) mit dem SMN Protein und mit der mRNA für  $\beta$ -Aktin.

Zu diesen Substanzen zählen Nukleinsäuresequenzen, welche für Ribonukleoproteine hnRNP-R und -Q kodieren und welche in die Nervenzelle mit den dem Fachmann bekannten Verfahren wie beispielsweise mit Hilfe von dem Fachmann

bekannten viralen Vektoren oder nicht viralen Vektoren eingeführt werden.

Zu diesen Substanzen zählen jedoch auch Wirkstoffe, welche  
5 auf die Nervenzelle derart einwirken, dass die Nervenzelle verstärkt Ribonukleoproteine, im Besonderen hnRNP-R und/oder hnRNP-Q Proteine bildet.

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren Verfahren zur  
10 Suche nach Wirkstoffen, welche die Komplexbildung von Ribonukleoproteinen, im Besonderen von hnRNP-R und/oder hnRNP-Q in Nervenzellen verstärken, wobei eine Zelle in Kontakt gebracht wird mit der zu prüfenden Substanz und in der Zelle die Menge an  $\beta$ -Aktin allein oder mit mindestens  
15 einer weiteren Komponente des Komplexes bestimmt wird.

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren die Verwendung eines erfindungsgemäßen Wirkstoffes für die Diagnose, die Prophylaxe und /oder Therapie einer neurodegenerativen  
20 Erkrankung oder einer Nervenschädigung durch Verletzung oder Vergiftung.

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren der Nachweis von  $\beta$ -Aktin allein oder mit mindestens einer weiteren Kompo-  
25 nente des Komplexes zur Diagnose und/oder Verlaufskontrolle einer neurogenerativen Erkrankung. Ein derartiger Nachweis erfolgt entweder molekularbiologisch mit Hilfe von Nukleotidsequenzen, welche mit der gesamten oder mit Teilen der Nukleotidsequenz von  $\beta$ -Aktin spezifisch hybrid-  
30 isieren beispielsweise unter Anwendung der dem Fachmann bekannten in situ Hybridisierung oder Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) oder der Nachweis erfolgt mit Hilfe von Antikörpern oder

Antikörperfragmenten, welche an Aktin oder spezifisch  $\beta$ -Aktin binden oder durch andere Substanzen, welche spezifisch Aktin binden wie z.B. Fluoreszenz-markiertes Phalloidin oder Phalloidin.

5

Bezüglich Methoden zum Nachweis bzw. zur Bestimmung einer oder mehrerer Komponenten eines erfindungsgemäßen Testsystems wird ausdrücklich auf die Beispiele verwiesen.

- 10 Unter den Begriff der Ribonukleoproteine (RNP) fallen insbesondere alle snRNP, einschließlich aller Splicevarianten bzw. Isoformen, humaner sowie nicht humaner Herkunft. Nicht hierunter fallen nicht-funktionale Mutationen. Entsprechendes gilt für SMN Proteine und  $\beta$ -Aktin. Der Begriff
- 15 nicht-funktional bezeichnet dabei Mutationen, die in einem ansonsten erfindungsgemäßen Testsystem keine Komplexbildung RNP/SMN/ $\beta$ -Aktin mRNA zeigen. Die Sequenz von human hnRNP-R ist unter der Accessionnummer AF000364.1 bekannt. Eine neuere Version ist unter der Accessionnummer
- 20 NM\_005826 bekannt. Sequenzen von human hnRNP-Q (3 Splicing Isoformen: Q1, Q2 und Q3) sind unter den Accessionnummern AY034483, AY034482 und AY034481, respektive, bekannt. Die Sequenz von Maus hnRNP-R ist unter der Accessionnummer AF441128 bekannt. Die Sequenz von Maus hnRNP-Q ist unter
- 25 der Accessionnummer AF093821 bekannt. Die Sequenz von human SMN ist unter der Accessionnummer AH006635 bekannt. Die Sequenz von human  $\beta$ -Aktin ist unter der Accessionnummer NM\_001101 (mRNA) bekannt. Im Rahmen der Erfindung sind auch funktionale Teilsequenzen sowie Bindungsregionen der
- 30 Komponenten einsetzbar. Hierunter fallen beispielsweise der 3' untranslatierte Bereich der  $\beta$ -Aktin mRNA sowie die "zipcode" Region.



Die galenische Herrichtung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann in fachüblicher Weise erfolgen. Als Gegenionen für ionische Verbindungen kommen beispielsweise  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  oder Cyclohexylammonium infrage.

5 Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro-) Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen (i.v., i.p., i.m.) sowie Präparate mit protrahierter

10 Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler, Verwendung finden. Als Hilfsstoffe sei Magnesiumcarbonat, Titandioxyd, Lactose, Mannit und andere Zucker, Talcum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Zellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuss- oder Sesamöl, Polyethylenglycole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole,

20 beispielsweise Glycerin, genannt. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist dadurch herstellbar, dass mindestens eine erfindungsgemäß verwendete Substanz in definierter Dosis mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und ggf. weiteren

25 geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen gemischt und zu der gewünschten Darreichungsform hergerichtet ist.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Beispielen näher erläutert.

B

Beispiel 1: Messung des Axon-Wachstums von Motoneuronen  
aus einem Mausmodell für Spinale Muskelatro-  
phie (SMA)

- 5 Primäre Motoneurone wurden aus dem lumbalen Rückenmark von Smn-/-; SMN2 Mäusen und Smn+/+; SMN2 Kontrollen isoliert. In diesem Modell für Spinale Muskelatrophie (SMA) wird humanes SMN2 als Transgen in Mäusen mit deletiertem Smn (Schränk et al., 1997) exprimiert (Monani et al., 2000).
- 10 Die Motoneurone wurden nach bereits beschriebenen Methoden kultiviert (Wiese et al., 1999). Spinale Motoneurone wurden am Embryonaltag 14 aufgrund ihrer Bindung an mit Anti-p75 Neurotrophin-Rezeptor Antikörper beschichtete Kulturschalen isoliert und in einer Dichte von 3000 Zellen
- 15 /cm<sup>2</sup> in 6-Well Kulturschalen (Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) auf Glasplättchen ausplat-  
tiert, welche mit Poly-Ornithin und Laminin beschichtet worden waren (Wiese et al., 1999; Wiese et al., 2001). Die Zellen wurden in Neurobasal-Medium (Fa. Invitrogen, Carls-
- 20 bad, Kalifornien, USA) mit Pferdeserum, 500 µM Glutamax und 50 µg/ml Apotransferrin bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kul-  
tiviert. Die Genotypisierung der Embryonen erfolgte nach einer beschriebenen Methode (Monani et al., 2000). CNTF und BDNF wurden zu einer Endkonzentration von 10 ng/ml
- 25 zugegeben. Die Hälfte des Mediums wurde am ersten Tag und jeden zweiten Tag ersetzt. Zur Messung der Neuritenlänge wurden die Motoneurone, nachdem sie 5 Tage lang kultiviert worden waren, mit 4% Paraformaldehyd in gepufferter Kochsalzlösung (PBS) fixiert und mit Aceton nachfixiert.
- 30 Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 10 % Albumin aus Rinderserum (BSA) wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit den folgenden Antikörpern inkubiert: Kaninchen Antikörper gegen Phospho-Tau (Fa. Sigma, St.

Louis, Missouri, USA; 1 µg/ml) und ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen MAP-2 (Fa. Chemicon, Pittsburg, Pennsylvania, USA; 1:1000). Die Zellen wurden dreimal mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Triton X-100 (TBS-T) gewaschen, eine Stunde mit Cy2 und Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland; 1:200) und nach neuerlichem Waschen mit TBS-T wurden die Zellen in Mowiol (Fa. Sigma, St. Louis, Missouri) eingebettet.

10

Die gefärbten Zellen wurden am Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop eingescanned (Leica, Solms, Deutschland). Die Färbung mit Anti-Phospho-Tau identifiziert axonale Fortsätze. Die Länge der Fortsätze wurde mittels des „Scion Image“ Software-Programms gemessen (Fa. Scion Corp. Frederick, Maryland, USA).

Dabei zeigten die von Smn<sup>-/-</sup>; SMN2 Mausembryos gewonnenen Motoneurone eine spezifische Reduktion der Länge der Phospho-Tau positiven Axone (-27%) im Vergleich zu Smn<sup>+/+</sup>; SMN2 Kontrollen (224.7±20.5 µm vs. 307.6±23.1 µm). Das Ergebnis lässt auf ein reduziertes Axon-Wachstum infolge verringerter Menge an Smn-Protein schließen.

25

Beispiel 2: Messung des Neuritenwachstums in transient mit Smn oder hnRNP-R und -Q transfizierten PC12 Zellen

30 Phaeochromozytom-Zellen aus der Ratte (PC12) wurden in DMEM (Fa. Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) + 10% Pferdeserum und 5% fötalem Kälberserum + Antibiotika kultiviert. Vor der Transfektion wurden die Zellen in hoher

Dichte in 24-Well Kulturschalen ausplattiert und mit 1 µg Plasmid-DNA transfiziert (Lipofectamine 2000, Fa: Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). Dazu wurden Expressionsplasmide verwendet, in welche mit Epitop-Tags (HA-Tag oder FLAG-Tag) markierte Wildtyp-Formen oder mutierte Versionen von Smn, hnRNP R oder hnRNP Q kloniert worden waren. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in 35mm Kulturschalen auf Poly-DL-Ornithin beschichteten Glasplättchen in einer Dichte von 1000 Zellen / cm<sup>2</sup> ausplattiert. Als Differenzierungsmedium wurde DMEM + 2% Pferdeserum und 1% fötalem Kälberserum + 50 ng/ml NGF + Antibiotika verwendet. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die PC12 Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in gepufferter Kochsalzlösung (PBS) fixiert. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 15 % Ziegenserum + 0,3 % Triton X-100 wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit den folgenden Antikörpern inkubiert: Kaninchen Antikörper gegen hnRNP R (Rossoll et al., 2002; 1/1000), Anti-Neurofilament H (Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA; 1:400), Anti-HA (HA.11, Fa. Covance, Denver, Pennsylvania, USA; 1:250) und Anti-FLAG M2 (Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA, 1:500). Die Zellen wurden dreimal mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Triton X-100 (TBS-T) gewaschen, 1 Stunde mit Cy2 und Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland, 1:200). Nach neuerlichem Waschen mit TBS-T wurden die Zellen in Mowiol eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop oder Konfokalmikroskop wie oben angegeben ausgewertet.

30

Transient transfizierte PC12 Zellen welche die Wildtyp-Form von Smn, hnRNP R oder Q überexprimierten, wiesen im Vergleich zu den Kontrollen einen etwa 25-30%igen Zuwachs

an Neuritenwachstum auf. Smn mit einer Punktmutation welche keine Interaktion mit hnRNP R zeigt (Rossoll et al., 2002) und welche auch in SMA-Patienten gefunden wurde (SmnY272C) hatten keinen stimulierenden Effekt. Auch mutiertes hnRNP R mit einer Deletion der ersten beiden RNA-Bindungsdomänen (von Aminosäure 166-331) oder der Deletion der Smn-Interaktionsdomäne (von Aminosäure 522-556) förderte nicht das Neuritenwachstum. Eine Co-Expression von der Wildtyp-Form von Smn mit mutiertem hnRNP R unterdrückte den Wachstums-fördernden Effekt. Umgekehrt machte eine Co-Expression von der Wildtyp-Form von hnRNP R mit dem mutierten Smn ebenfalls den Wachstums-fördernden Effekt zunichte.

Zusammen zeigen diese Experimente, dass der Neuritenwachstums-fördernden Effekt von Smn und hnRNP R nur bei den Wildtyp-Formen auftritt, die miteinander interagieren können.

20

Beispiel 3: Messung des Neuritenwachstums in Smn oder hnRNP-R oder -Q überexprimierenden stabilen PC12 Zelllinien

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden PC12 Zellen wie oben beschrieben kultiviert und mit Expressionsvektoren für die Wildtyp-Form oder mutiertes Smn, hnRNP-R oder hnRNP-Q transfiziert. Danach wurden die Zellen in geringer Zelldichte mit dem Antibiotikum G418 auf ihre Neomycin-Resistenz hin selektiert. Individuelle Klone wurden auf ihre stabile Expression der zu exprimierenden Konstrukte durch Westernblot-Analyse getestet. Zur Messung der Neuritenlänge wurden die Zellen wie oben beschrieben auf

beschichtete Glasplättchen ausplattiert, durch Zugabe von Differenzierungsmedium differenziert und nach sieben Tagen fixiert, gefärbt und das Neuritenwachstum quantifiziert wie oben beschrieben.

5

PC12 Zelllinien welche die Wildtyp-Form von hnRNP R und Q überexprimieren zeigten etwa dreimal längere Neuriten als die untransfizierten oder mit dem leeren Plasmid transfizierten Kontroll-Zelllinien. Zelllinien welche hnRNP R ohne RNA-Interaktionsdomänen oder Smn-Interaktionsdomäne (siehe oben) überexprimieren, wiesen kein verstärktes Neuritenwachstum auf. Der Effekt war stärker als in den transient transfizierten Zelllinien, da die stabilen Zelllinien über einen längeren Zeitraum (sieben statt drei 15 Tage) differenziert werden konnten.

Beispiel 4: Nachweis von Smn und hnRNP R sowie des  $\beta$ -Aktin Gehalts in Axonen und Wachstumskegeln von Motoneuronen 20

Die Kultivierung der Motoneurone sowie die Fixierung, Färbung und Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Als Antikörper wurden monoklonaler anti-Smn Antikörper (Fa. BD 25 Biosciences, Lexington, Kentucky, USA; 1:500), Kaninchen Anti-hnRNP R Antikörper (Rossoll et al., 2002; 1/1000), Anti-Aktin (Fa. Roche, Basel, Schweiz; 1:200) und  $\beta$ -Aktin (Fa. Abcam, Cambridge, UK; 1:1000) verwendet. Da in Neuriten vorzugsweise  $\beta$ -Aktin lokalisiert ist, sind die Ergebnisse für Anti-Aktin und spezifischen Anti- $\beta$ -Aktin 30 ähnlich.

In Motoneuronen von Kontroll-Mäusen war die  $\beta$ -Aktin-spezifische Färbung in den distalen Anteilen der Axone und den Wachstumskegeln konzentriert. In Motoneuronen von Smn-/-; SMN2 Mäusen war diese Färbung viel schwächer ausgeprägt. Die Färbungen mit Anti-Aktin und Anti- $\beta$ -Aktin Antikörpern zeigten ein ähnliches Ergebnis. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Smn für die Lokalisation von  $\beta$ -Aktin an den Wachstumskegeln erforderlich ist.

10 Immunzytochemie mit Anti-hnRNP R Antikörpern zeigte eine Färbung entlang der Neuriten mit einer Akkumulation in den Wachstumskegeln. In den Smn-/-; SMN2 Motoneuronen war die Färbung im Vergleich zu den Kontroll-Motoneuronen schwächer. Dieser Befund korreliert mit der beobachteten ausschließlichen Lokalisation von der hnRNP R Mutante ohne Smn-Interaktionsdomäne im Zellkern. Die Interaktion von hnRNP R mit Smn scheint für die distale Lokalisation von hnRNP R erforderlich zu sein. hnRNP R und Smn zeigen in den Axonen der kultivierten Motoneuronen Co-Lokalisation.

20

Beispiel 5: Nachweis von Smn und hnRNP R sowie des  $\beta$ -Aktin-Gehalts in Neuriten und Wachstumskegeln von kultivierten Zelllinien

25

Die Kultivierung der PC12 Zelllinien sowie die Fixierung, Färbung und Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Als Antikörper wurden monoklonaler anti-Smn Antikörper (Fa. BD Biosciences, Lexington, Kentucky, USA; 1:500), Kaninchen Anti-hnRNP R Antikörper (Rossoll et al., 2002; 1/1000), Anti-Aktin (Fa. Roche, Basel, Schweiz; 1:200) und  $\beta$ -Aktin (Fa. Abcam, Cambridge, UK; 1:1000) verwendet. Da in Neuriten vorzugsweise  $\beta$ -Aktin lokalisiert ist, sind die

Ergebnisse für Anti-Aktin und spezifischen Anti- $\beta$ -Aktin  
ähnlich.

Die Färbungen zeigten in den die Wildtyp-Form von hnRNP R  
5 Überexprimierenden PC12 Zelllinien und in den mit dem  
leeren Plasmid transfizierten Kontroll-Zelllinien eine  
starke Konzentration von  $\beta$ -Aktin in den Wachstumszonen der  
Neuriten. In Zelllinien welche die Deletionsmutante ohne  
RNA-Bindedomänen überexprimieren, war nur eine schwache  
10 Färbung in den Wachstumszonen messbar. Dieser dominant  
negative Effekt lässt darauf schließen, dass funktionelles  
hnRNP R für die richtige Lokalisation von  $\beta$ -Aktin benötigt  
wird. Die Wildtyp-Formen von Smn und hnRNP R zeigten in  
den Neuriten der Zelllinien Co-Lokalisation.

15

Beispiel 6: Nachweis der Bindung von  $\beta$ -Aktin mRNA an hnRNP  
R

20 Die untranslatierten 3' Region von  $\beta$ -Aktin vom Stop-Codon  
bis zur Poly-A Sequenz oder die sogenannte „zipcode-  
Region“ (Kislauskis et al., 1994) wurden durch RT-PCR am-  
plifiziert und in ein Plasmid mit der Bindungsstelle für  
die T7 RNA-Polymerase kloniert (pT219). Wahlweise wurde  
25 ein Poly-A-Schwanz von 30 Nukleotiden angefügt. (Verwen-  
dete Primer: actinUTRfwd ATGAAAGCTTAGGCGGACTGTTACTGAGCTGC,  
actinUTRpolyAfullrev  
ATGAGAATTC-T(30)-GTGTAAGGTAAGGTGTGCAC, actinUTRpolyAziprev  
ATGAGAATTC-T(30)-CTGCGCAAGTTAGGTTTTGTC, actinUTRfullrev  
30 ATGAGGATCCGTGTAAGGTAAGGTGTGCAC.) Die Plasmide wurden durch  
Verdau mit EcoRI am 3' Ende linearisiert und aufgereinigt.  
0,2  $\mu$ g wurden für die RNA-Synthese mittels in vitro Tran-  
skription mit dem radioaktiv markierten Nukleotid  $\alpha$ 32P-CTP



- verwendet. (T7 Transcription Kit, Fa. MBI Fermentas, Vilnius, Litauen). Die markierte transkribierte RNA wurde über Zentrifugation mittels G-25 Säulchen (Fa. Amersham, Piscataway, New Jersey, USA) aufgereinigt.
- 5 Eine Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) wurde mit durch HA-Epitop-markierte Expressionskonstrukte für die Wildtyp-Formen oder mutierte Versionen von Smn oder hnRNP R transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in Lysepuffer lysiert (25 mM Tris-HCl
- 10 pH=8.0, 137 mM NaCl, 2mM EGTA, 2 mM EDTA, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100, 0,05 %  $\beta$ -Mercaptoethanol and Proteaseinhibitoren; Fa. Roche, Basel, Schweiz) und die HA-markierten Proteine durch Immun-Präzipitation mit Anti-HA-Agarose (HA.11, Fa. Covance, Denver, Pennsylvania; USA)
- 15 aufgereinigt. Die Immunkomplexe wurden fünfmal mit dem Lyse-Puffer und einmal mit RBB-Puffer gewaschen (RBB: 10 mM Tris pH=7,5, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 2 mM DTT und 0,25 % Triton X-100) und mit der markierten RNA 30 Minuten bei Raumtemperatur in RBB-Puffer inkubiert. Die RNA-
- 20 Protein-Komplexe wurden mit dreimal RBB-Puffer und RBB-Puffer + 5mg/ml Heparin (Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA) gewaschen. Die Pellets wurden in 20  $\mu$ l RBB-Puffer resuspendiert, und aus Nitrozellulose-Filter aufgetragen (Protran, Fa. Schleicher & Schuell BioScienceGmbH,
- 25 Dassel/Reilhehausen, Deutschland). Diese Filter wurden mit Phospho-Imager-Platten (BAS-2500, Fa. Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) exponiert und die gebundene Radioaktivität wurde als Photo-stimulierte Lumineszenz [PSL] mittels des AIDA Software Pakets gemessen (Fa.
- 30 Raytest, Straubenhardt, Deutschland).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Wildtyp-Form, jedoch nicht die mutierten Versionen (siehe oben) von hnRNP R an

den 3' untranslatierten Bereich von  $\beta$ -Aktin mRNA binden. Diese Bindung erfolgte unabhängig von dem Poly-A-Schwanz. Auch die „zipcode“-Region allein zeigt spezifische Bindung.

5

Diese Ergebnisse demonstrierten nicht nur eine Bindung von hnRNP R an  $\beta$ -Aktin mRNA, sondern legen auch nahe, dass die Interaktion mit Smn für diese Bindung erforderlich ist, da die mutierte Version ohne die Smn-Interaktionsdomäne keine  
10  $\beta$ -Aktin mRNA-Bindung zeigten.

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass ein Komplex von Smn und hnRNP R oder Q an  $\beta$ -Aktin mRNA bindet und in Axone von Motoneurone aber auch andere  
15 Neuriten transloziert. Störungen dieser Komplexe führen zu reduzierten  $\beta$ -Aktin Konzentrationen an den Wachstumszonen der Neuriten und damit zu vermindertem Axon-Wachstum.

#### Literatur:

- 20 Buhler, D. et al., 1999, Hum. Mol. Genet., 8, 2351-2357.  
Cisterni, C. et al., 2001, Neurobiol. Dis., 8, 240-251.  
Crawford, T.O. et al., 1996, Neurobiol. Dis., 3, 97-110.  
Fischer, U. et al., 1997, Cell, 90, 1023-1029.  
Friesen, W.J. et al., 2001, Mol. Cell, 7, 1111-1117.  
25 Jablonka, S. et al., 2000, Hum. Mol. Genet., 9, 341-346.  
Kislauskis, E.H. et al., 1994, J. Cell Biol., 127, 441-451.  
Korinthenberg, R. et al., 1997, Ann. Neurol., 42, 364-368.  
Krecic, A.M. et al., 1999, Curr. Opin. Cell Biol., 11, 363-371.  
30 Lefebvre, S. et al., 1995, Cell, 80, 155-165.  
Lefebvre, S. et al., 1997, Nat. Genet., 16, 265-269.  
Liu, Q. et al., 1996, EMBO J., 15, 3555-3565.  
Meister, G. et al., 2000, Hum. Mol. Genet., 9, 1977-1986.

- Monani, U.R. et al., 2000, Hum. Mol. Genet., 9, 333-339.  
Mourelatos, Z. et al., 2001, EMBO J., 20, 5443-5452.  
Pellizzoni, L. et al., 2001, Curr. Biol., 11, 1079-1088.  
Rossoll, W. et al., 2002, Hum. Mol. Genet., 11, 93-105.  
5 Schränk, B. et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,  
94, 9920-9925.  
Selenko, P. et al., 2001, Nat. Struct. Biol., 8, 27-31.  
Tucker, K.E. et al., 2001, J. Cell Biol., 154, 293-307.  
Wiese, S. et al., 1999, Eur. J. Neurosci., 11, 1668-1676.  
10 Wiese, S. et al., 2001, Nat. Neurosci., 4, 137-142.

15

20

25

30

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Suche oder Prüfung von Wirksubstanzen,  
welche das Wachstum und das Überleben von Nervenzellen  
beeinflussen, wobei eine Zelle in Kontakt gebracht wird  
mit mindestens einer prospektiven Wirksubstanz, wobei  
nachfolgend in dieser Zelle die mRNA des  $\beta$ -Aktin oder  
das  $\beta$ -Aktin Protein allein oder gemeinsam mit dem SMN  
Protein und/oder einem Ribonukleinprotein hnRNP, insbe-  
sondere dem Ribonukleoprotein hnRNP-R und/oder hnRNP-Q,  
bestimmt werden, beispielsweise in Wachstumszonen von  
Neuriten, wobei die dabei ermittelten Mengen dieser  
Komponenten verglichen werden mit den Mengen an diesen  
Komponenten in einer Zelle, welche nicht mit der  
prospektiven Wirksubstanz in Kontakt gebracht wurde,  
und wobei im Falle einer erhöhten Menge die Wirksub-  
stanz selektiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine, mehrere oder  
alle Komponenten mit Antikörpern oder Antikörperfrag-  
menten nachgewiesen und optional quantitativ bestimmt  
werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei  $\beta$ -Aktin mit  
Aktin-bindenden Substanzen nachgewiesen und optional  
quantitativ bestimmt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei eine,  
mehrere oder alle Komponenten durch Messung ihrer mRNA  
nachgewiesen und optional quantitativ bestimmt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die  
Zelle eine Nervenzelle ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Zelle mesodermalen oder endodermalen Ursprungs ist.
- 5 7. Testsystem zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, mit einer Zelle, Zellen einer Zelllinie, oder einer Zellen enthaltenden Gewebeprobe, mit Mitteln zur Kultivierung der Zellen, sowie mit Mitteln zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung  
10 einer, mehrerer oder aller Komponenten.
8. Verwendung des Testsystems nach Anspruch 7 zur Suche nach Wirksubstanzen, welche das Wachstum und Überleben von Nervenzellen anregen und/oder welche das Wachstum  
15 von Neuriten und Axonen anregen.
9. Verwendung des Testsystems nach Anspruch 7 zur Prüfung des Wachstums und des Überlebens von Nervenzellen, insbesondere zur Diagnose und/oder Verlaufkontrolle einer  
20 neurodegenerativen Erkrankung und/oder Nervenschäden durch Verletzungen oder Vergiftungen.
10. Wirksubstanz erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei diese Wirksubstanz in  
25 einer Zelle die Menge an Komplexen enthaltend die Komponenten Ribonukleinproteine, insbesondere hnRNP-R und/oder hnRNP-Q, SMN und  $\beta$ -Aktin mRNA erhöht.
11. Verwendung einer Wirksubstanz nach Anspruch 10 zur  
30 Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Förderung des Wachstums und des Überlebens von Nervenzellen, insbesondere zur Prophylaxe oder Therapie

neurodegenerativer Erkrankungen und/oder Nervenschäden  
durch Verletzungen oder Vergiftungen.

5

10

15

20

25

30

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Suche oder Prüfung von Wirksubstanzen, welche das Wachstum und das Überleben von Nervenzellen beeinflussen, wobei eine Zelle in Kontakt gebracht wird mit mindestens einer Substanz und nachfolgend in dieser Zelle die mRNA des  $\beta$ -Aktin oder das  $\beta$ -Aktin Protein allein oder gemeinsam mit dem SMN Protein und/oder einem Ribonukleinprotein hnRNP, insbesondere dem Ribonukleoprotein hnRNP-R und/oder hnRNP-Q, bestimmt werden und die ermittelten Mengen dieser Komponenten verglichen werden mit den Mengen an diesen Komponenten in einer Zelle, welche nicht mit der prospektiven Wirksubstanz in Kontakt gebracht wurde, ein Testsystem zur Durchführung dieses Verfahrens sowie Verwendungen solcher Testsysteme.

20

25

30

GESAMT SEITEN 28